

L1 ANSWER 1 OF 1 WPIDS (C) 2003 THOMSON DERWENT  
AN 1989-003068 [01] WPIDS  
DNC C1989-001359  
TI Microorganism for producing alkali protease - selected from  
Corynebacterium.  
DC D16  
PA (ONOD) ONODA CEMENT CO LTD  
CYC 1  
PI JP 63279782 A 19881116 (198901)\* 8p <--  
ADT JP 63279782 A JP 1987-115453 19870512  
PRAI JP 1987-115453 19870512  
AB JP 63279782 A UPAB: 19930923

The microorganism producing alkali protease is selected from  
Corynebacterium sp. No. 67 (FRI 9335), Corynebacterium sp No. 68A (FRI  
9336) and Corynebacterium sp. No. 68B (FRI 9337), has the following  
characteristics: (a) 0.3-0.6 microns short dia. and 1-4 microns long dia.;  
(b) no heat resistant mycelium; (c) gram positive; (d) good growth on meat  
extract agar medium and meat extract liq. medium; (e) liquefaction on meat  
extract gelatin at pH 10.5; (f) no redn. of nitrate under anaerobic  
conditions; (g) no growth in denitration reaction under anaerobic  
conditions; (h) negative to VP test in alkaline medium; (i) hydrolyses  
starch; (j) no utilisation of nitrate and ammonium salt; (k) no prodn. of  
pigment; (l) negative to oxidase and catalase; (m) optimum growth in pH  
8.6-12.5 and at about 37 deg.C; (n) aerobic property, no growth in O-F  
test under anaerobic conditions; (o) acid prodn. from sugar of L-arabinose  
(-), D-xylose (-), D-glucose (+), D-mannose (-), D-fructose (+),  
D-galactose (-), maltose (+), sucrose (+), lactose (- in 67 and 68B and +  
in 68A), trehalose (+), D-sorbitol (-), D-mannitol (-), inositol (-),  
glycerine (+) and starch (+); (p) liquefaction of gelatin, and (q) growth  
on medium contg. 12% of sodium chloride.

0/3

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **63279782 A**

(43) Date of publication of application: **16.11.88**

(51) Int. Cl

**C12N 1/20**  
**C12N 9/52**  
**//(C12N 1/20 , C12R 1:15 )**

(21) Application number: **62115453**

(22) Date of filing: **12.05.87**

(71) Applicant: **ONODA CEMENT CO LTD**

(72) Inventor:  
**IGUCHI KAZUKO**  
**ISHIKAWA NAKO**  
**YABUKI MINORU**  
**ANDO SHOICHI**

(54) **MICROORGANISM PRODUCING ALKALINE  
PROTEASE**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain an alkaline protease useful as an excellent enzyme for adding to detergent, by culturing a microbial strain belonging to *Corynebacterium* genus in an alkaline medium.

CONSTITUTION: An alkaline protease having the following physical and chemical properties can be produced by culturing *Corynebacterium* sp. No.67 (FERM P-9335), *Corynebacterium* sp. No.68A (FERM P-9336) or

*Corynebacterium* sp. No.68B (FERM P-9337) in a nutrient medium. Action, casein decomposition activity in a reaction solution containing a detergent component is  $\approx 70\%$  of the activity in the absence of detergent; optimum pH and stable pH, optimum pH is 10W10.6 and stable in pH7W10.5; working temperature, about 50°C; inhibition, activation and stabilization, thermal stability is increased by  $\text{Ca}^{2+}$  and the activity is uninhibited by MIA and EDTA and inhibited by diisopropyl fluorophosphate; molecular weight, the molecular weight of an enzyme produced by 68A strain is about 14,600.

COPYRIGHT: (C)1988,JPO&Japio

## ⑯ 公開特許公報(A)

昭63-279782

① Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ④ 公開 昭和63年(1988)11月16日  
 C 12 N 1/20 8515-4B  
 9/52 8717-4B  
 //(C 12 N 1/20  
 C 12 R 1:15) 審査請求 未請求 発明の数 2 (全8頁)

② 発明の名称 アルカリプロテアーゼ産生微生物

① 特 願 昭62-115453

② 出 願 昭62(1987)5月12日

③ 発 明 者 井 口 和 子 東京都中央区晴海1-7-13-401  
 ③ 発 明 者 石 川 直 子 東京都世田谷区南烏山3-11-20-203  
 ③ 発 明 者 矢 吹 稔 千葉県流山市江戸川台東4-376  
 ③ 発 明 者 安 藤 昭 一 千葉県船橋市西船1-24-11 西船橋セントラルマンション412号  
 ④ 出 願 人 小野田セメント株式会社 山口県小野田市大字小野田6276番地  
 社  
 ④ 代 理 人 弁理士 湯 浅 恭 三 外5名

## 明 細 書

## 1. [発明の名称]

アルカリプロテアーゼ産生微生物

## 2. [特許請求の範囲]

(1) 以下の菌学的性質を有するコリネバクテリウム属に属するコリネバクテリウム s.p. No. 67株(微工研菌寄第9335号)、コリネバクテリウム s.p. No. 68A株(微工研菌寄第9336号)、コリネバクテリウム s.p. No. 68B株(微工研菌寄第9337号)からなる群から選択されたアルカリプロテアーゼ産生微生物。

## 1) 形態

培地に生育した細胞について、観察すると  
 次の形態学的特徴を有する。

## ① 細胞の形及び大きさ

いずれの株も、短〜長桿菌であり、細胞両端は丸みをもつ。

大きさは、

No. 67 短径 0.5~0.6、長径 1~4 (μm)

No. 68A 短径 0.3~0.6、長径 1~3.5 (μm)

No. 68B 短径 0.5~0.9、長径 1~3 (μm)  
 である。

## ② 細胞の多形性

細胞の長さの他は認められない。

## ③ 運動性

いずれの株も運動性を有する。67株、68A株は数本の周鞭毛を有し、68B株は鞭毛を有さない。

## ④ 胞子

いずれの株も耐熱性胞子を形成しない。

## ⑤ グラム染色性

いずれの株も陽性であるが、培養が進むと陽性が弱くなる傾向がある。

## ⑥ 抗酸性

いずれの株も陰性である。

## 2) 次の各培地における生育状態

## ① 肉汁寒天培養

いずれの株も pH 10~10.5 で良好に生育し、平面培地においてコロニーは円形、隆起状、周縁は全縁で光沢があり不透明である。色は

質と糧の中間色である。培地中には色素を出さない。

#### ② 肉汁液体培養

いずれの株も良好に生育し、培地の混濁は見られず透明であり、沈澱も無い。

#### ③ 肉汁ゼラチン穿針培養

pH 10.5にていずれも層状に液化する。

#### 3) 生理学的性質

##### ① 硝酸塩の還元

いずれの株も嫌気条件下では還元しない。

##### ② 脱窒反応

いずれの株も嫌気条件下では生育しない。

##### ③ V P テスト

いずれの株もアルカリ性培地を用いた場合、陰性である。

##### ④ デンブンの加水分解

いずれの株も加水分解する。

##### ⑤ 無機窒素源（硝酸塩及びアンモニウム塩）の利用

いずれの株も硝酸塩、アンモニウム塩のい

ずれも利用しない。

##### ⑥ 色素の産生

いずれの株も産生しない。

##### ⑦ オキシダーゼ

いずれの株も陰性である。

##### ⑧ カタラーゼ

いずれの株も陰性である。

##### ⑨ 生育の範囲

i) 生育 pH: いずれの株も 8.0~12.5 で生育するが、pH 10 付近が最適である。pH 7 では殆ど生育しない。

ii) 生育温度: 87 株は 42℃ 以下で生育し、88A 株、88B 株は 45℃ 以下で生育する。いずれの株も 37℃ 付近が最適である。

##### ⑩ 酸素に対する態度

いずれの株も好気性である。

##### ⑪ O-F テスト

いずれの株も嫌気条件下では生育しない。

##### ⑫ 糖類から酸の産生

+ は生成することを示し、- は生成しない

-3-

ことを示す。

糖 類	87 株	88A 株	88B 株
L-アラビノース	-	-	-
D-キシロース	-	-	-
D-グルコース	+	+	+
D-マンノース	-	+	-
D-フラクトース	+	+	+
D-ガラクトース	-	-	-
麦芽糖	+	+	+
ショ糖	+	+	+
乳糖	-	+	-
トレハロース	+	+	+
D-ソルビット	-	-	-
D-マンニット	-	-	-
イノシット	-	-	-
グリセリン	+	+	+
でんぷん	+	+	+

#### 4) その他の性質

##### ① ゼラチンの液化

いずれの株も液化する。

-4-

#### ② 塩化ナトリウムの耐性

いずれの株も 12% 塩化ナトリウム存在下で生育する。

(2) コリネバクテリウム属に属するアルカリプロテアーゼ生産菌を培養し、培養物からアルカリプロテアーゼを得ることを特徴とするアルカリプロテアーゼの製造方法。

(3) 前記コリネバクテリウム属に属するアルカリプロテアーゼ生産菌がコリネバクテリウム s.p. No. 87 株（微工研菌寄第 9335 号）、コリネバクテリウム s.p. No. 88A 株（微工研菌寄第 9336 号）、コリネバクテリウム s.p. No. 88B 株（微工研菌寄第 9337 号）からなる群から選択された菌株であることを特徴とする特許請求の範囲第 2 項記載のアルカリプロテアーゼの製造方法。

#### 3. [発明の詳細な説明]

##### 産業上の利用分野

本発明はコリネバクテリウム属に属する新規な細菌、更に詳しくはアルカリプロテアーゼを産生

-5-

-444-

-6-

するコリネバクテリウム属に属する新規な細菌及びこれらの菌を培養し、その培養物からアルカリプロテアーゼを得ることからなる方法に関する、従来の技術

アルカリプロテアーゼは皮革工業、食品工業、繊維工業等様々な分野で大量に使用されている酵素である。

また、近年は洗剤の洗浄力を改善する目的で種々の酵素が洗剤に配合されている。特にアルカリプロテアーゼは蛋白汚垢を分解し、洗浄力の改善への寄与が大きいことが知られている。一方、洗剤用酵素は世界の工業用酵素市場の約30%を占めるものであり、洗剤に不可欠とさえ言われているアルカリプロテアーゼの需要は極めて大きい。従って、アルカリプロテアーゼの生産性の向上と共に、従来品にない特性を有する酵素の開発が望まれている。

このような状況下において現在はアルカリプロテアーゼ生産菌として好アルカリ性微生物のスクリーニングが盛んに行われている。好アルカリ性

バチルス属細菌では特公昭80-55118号、好アルカリ性放線菌では特公昭54-11396号に新規なアルカリプロテアーゼ生産菌を見いだしたことが記載されている。

発明が解決しようとする問題点

しかし、従来のようにバチルス属、放線菌からのみアルカリプロテアーゼを生産していたのでは需要十分答えることができない。又、種々の微生物から種々の特性を有するアルカリプロテアーゼを得ることが洗剤の洗浄力の向上のためには必要である。

問題点を解決するための手段

本発明者等は、安定性が高くかつ高活性のアルカリプロテアーゼを高い収率で生産する生産菌を自然界からスクリーニングした結果、新規な好アルカリ性コリネバクテリウムを見だし本発明を完成した。即ち、コリネバクテリウム属に属するコリネバクテリウム *s.p.*, No. 87株（微工研菌寄第9335号）、コリネバクテリウム *s.p.*, No. 88A株（微工研菌寄第9336号）、コリネバク

-7-

テリウム *s.p.*, No. 88B株（微工研菌寄第9337号）を提供することを目的とする。

更に、これらの菌株を培養し、培養物からアルカリプロテアーゼを生産する方法を提供することを目的とする。

コリネバクテリウム属細菌によるアルカリプロテアーゼ生産の報告は今までになく本発明が初めてのものである。

また、これらの菌をアルカリ性培地中で培養することにより得られるアルカリプロテアーゼは、高塩基性の洗剤溶液中でもカゼイン分解活性を示し、洗剤添加用として特に優れている。

次に本発明者等が自然界から分離採取した本菌株の分類学的性質を詳細に記載する。

#### 1) 形態

培地に生育した細胞について、顕微鏡すると次次の形態学的特徴を有する。

##### ① 細胞の形及び大きさ

いずれの株も、短〜長桿菌であり、細胞両端は丸みをもつ。

-8-

大きさは、

- No.87 短径 0.5~0.8、長径 1~4 (μm)  
No.88A 短径 0.3~0.6、長径 1~3.5 (μm)  
No.88B 短径 0.5~0.9、長径 1~3 (μm)  
である。

##### ② 細胞の多形性

細胞の長さの他は認められない。

##### ③ 運動性

いずれの株も運動性を有する。87株、88A株は数本の周鞭毛を有し、88B株は鞭毛を有さない。

##### ④ 胞子

いずれの株も耐熱性胞子を形成しない。

##### ⑤ グラム染色性

いずれの株も陽性であるが、培養が進むと陽性が弱くなる傾向がある。

##### ⑥ 抗酸性

いずれの株も陰性である。

#### 2) 次の各培地における生育状態

##### ① 肉汁寒天培養

-9-

-445-

-10-

いずれの株もpH10~10.5で良好に生育し、平面培地においてコロニーは円形、隆起状、周縁は全縁で光沢があり不透明である。色は黄と橙の中間色である。培地中には色素を出さない。

② 肉汁液体培養

いずれの株も良好に生育し、培地の混濁は見られず透明であり、沈澱も無い。

③ 肉汁ゼラチン穿針培養

pH10.5にていずれも層状に液化する。

3) 生理学的性質

① 硝酸塩の還元

いずれの株も嫌気条件下では還元しない。

② 脱窒反応

いずれの株も嫌気条件下では生育しない。

③ V-Pテスト

いずれの株もアルカリ性培地を用いた場合、陰性である。

④ デンプンの加水分解

いずれの株も加水分解する。

-11-

いずれの株も嫌気条件下では生育しない。

② 糖類から酸の産生

+は生成することを示し、-は生成しないことを示す。

糖 類	67株	68A株	68B株
L-アラビノース	-	-	-
D-キシロース	-	-	-
D-グルコース	+	+	+
D-マンノース	-	+	-
D-フラクトース	+	+	+
D-ガラクトース	-	-	-
麦芽糖	+	+	+
ショ糖	+	+	+
乳糖	-	+	-
トレハロース	+	+	+
D-ソルビット	-	-	-
D-マンニット	-	-	-
イノシット	-	-	-
グリセリン	+	+	+
でんぷん	+	+	+

-13-

⑤ 無機窒素源(硝酸塩及びアンモニウム塩)の利用

いずれの株も硝酸塩、アンモニウム塩のいずれも利用しない。

⑥ 色素の産生

いずれの株も産生しない。

⑦ オキシダーゼ

いずれの株も陰性である。

⑧ カタラーゼ

いずれの株も陰性である。

⑨ 生育の範囲

i) 生育pH: いずれの株も8.0~12.5で生育するが、pH10付近が最適である。pH7では殆ど生育しない。

ii) 生育温度: 67株は42℃以下で生育し、68A株、68B株は45℃以下で生育する。いずれの株も37℃付近が最適である。

⑩ 酸素に対する態度

いずれの株も好気性である。

⑪ O-Fテスト

-12-

4) その他の性質

① ゼラチンの液化

いずれの株も液化する。

② 塩化ナトリウムの耐性

いずれの株も12%塩化ナトリウム存在下で生育する。

本菌株は、抗酸性陰性、オキシダーゼテスト陰性、カタラーゼテスト陽性で、グラム陽性の桿菌であることよりバチルス、アースロバクター、クルジア、コリネバクテリウム属のいずれかに属する細菌であると考えられる。更に、耐熱性因子をつくらないことからバチルス属ではなく、顕著な多形性を示さないことからアースロバクターではなく、炭水化物からの酸生成状況からクルジアではないと考えられる。一方、硝酸塩の還元性、炭酸の生成、成育温度よりコリネバクテリウム属の細菌である。しかし、中性付近のpHでの成育が悪く、pH10.5付近で最も良く成育することから既知のコリネバクテリウム属の菌株とも区別される。尚、上記の検索に当たっては、Bergey's

-446-

-14-

Manual of Systematic Bacteriology 第9版、第1巻(1984)、第2巻(1987)(The Williams & Wilkins Company, U.S.A.出版)を用いた。

以上のように本発明の菌株は在来のコリネバクテリウム属の菌株とは異なるがコリネバクテリウム属に属する新規な菌株である。

次に本発明の新規な菌株をアルカリ性培地にて培養し、培養物より分離して得られるアルカリプロテアーゼの特性を説明する。

#### ① 作用

それ自体はプロテアーゼ活性を示さない家庭用洗剤を洗濯条件下と同じ温度で含む反応液において、いずれの菌株の培養によって得られたアルカリプロテアーゼも洗剤非存在下の70%以上のカゼイン分解活性を示す。

#### ② 力価の測定法

アルカリプロテアーゼ活性の測定

カゼイン0.75%を含む $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$ 緩衝液

(pH10.6) 0.8 mlに酵素液0.2 mlを加え、37

-15-

pH10.3~10.7に $\text{NaHCO}_3$ - $\text{NaOH}$ 緩衝液

(▲-▲)

pH10.7~11.3に $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaOH}$ 緩衝液

(■-■)

を用いた。

#### ④ 作用温度の範囲

いずれの株も2 mM  $\text{CaCl}_2$ を含む液において50℃付近である。第2図にプロテアーゼ活性と反応温度の関係を示す

#### ⑤ pH、温度などによる失活の条件

67株、68B株の生産する酵素は、2 mMの $\text{CaCl}_2$ を含むpH10.6の $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$ による10分間の熱処理では40℃まで安定であり、45℃で55%の残存活性を示し、55℃で完全に失活する。

68A株の生産する酵素は、40℃まで安定であり、45℃で70%の残存活性を示し、55℃で完全に失活する。第3図に処理温度と活性との関係を示す。

#### ⑥ 阻害、活性化及び安定化

いずれの株の生産する酵素の熱安定性も $\text{Ca}^{2+}$

で10分間反応させた後、5%のトリクロロ酢酸溶液を4 ml加え、更に37℃にて20分間放置する。生じた沈澱を除去し、上澄液の280nmにおける吸光度を測定する。1単位(1 U)の酵素とは、上記条件下で1分間に1 μgに相当するナロシンを生成する酵素量とする。

#### ⑦ 至適pH及び安定pH範囲

i) 至適pH: いずれの菌株から生産される酵素もpH10~10.6である。

ii) 安定pH範囲: いずれの菌株から生産される酵素も37℃における処理でpH7~10.5である。第1図にプロテアーゼ活性と反応pHとの関係を示す。活性測定には、

pH3.9~5.6に酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液

(●-●)

pH6.3~7.3に $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液

(○-○)

pH6.8~8.0にTris-HCl緩衝液 (△-△)

pH9.3~10.6に $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$ 緩衝液

(□-□)

-16-

により増大し、MIA(モノヨード酢酸)及びEDTA(エチレンジアミン四酢酸)では阻害されず、(ジイソプロピルフルオロリン酸)で阻害される。

#### ⑧ 分子量

68A株の生産する酵素の分子量は、約14,600(ゲルろ過法による)である。

次に本発明の実施例について説明する。

#### 実施例

##### 菌株のスクリーニング方法

採取した土壌の少量を滅菌水に懸濁し、懸濁液の一白金耳をスキムミルクを含む寒天培地(スキムミルク10g、肉エキス5g、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20g、寒天20g、水1 lからなる)に塗抹する。37℃で数日間培養し、コロニーの周りのスキムミルクを溶かすものを選抜し、一次スクリーニングとした。このようにして得た菌株につき液体培養を行い、培養液の酵素活性を測定し、二次スクリーニングとした。更に、pH10.3~10.5、界面活性剤を0.93 g/l含む洗剤成分中での酵素活性を測定し、耐性

が高かった67株、68A株、68B株を選抜した。

#### 実施例 1

培地は、1ℓの水に大豆ペプトン10g、酵母エキ  
ス5g、グルコース2g、 $K_2HPO_4$  1g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   
0.2g、 $Na_2CO_3$  20gを含むものを用いた。これを  
121℃、15分間の滅菌をし( $Na_2CO_3$ は別滅菌した)、  
三角フラスコに100mlずつ分注し、これにあらか  
じめ同じ培地で16~18時間培養した新鮮な菌を接  
種し、37℃にて3日間振盪培養した。この培養物  
より菌体を除去し、ろ液を酵素液として得た。こ  
の酵素液のアルカリプロテアーゼ活性は 345U/  
mlであった。

#### 参考例 1

実施例1に示したような方法で得られた培養上  
清液に硫酸アンモニウムを60%飽和となるよう  
に加え、沈澱を遠心分離により得て、凍結乾燥した。  
これをpH7または10.8の緩衝液に再懸濁し、実  
験に供した。

上記のようにして調整した酵素液における洗剤  
成分の影響を調べた。

洗剤成分を含む反応液中でのカゼイン分解力  
を測定したところ、それぞれの酵素は洗剤成分を  
含まない反応液での活性を100%としたとき、67  
株、68A株の酵素では70.5%、68B株の酵素では  
72%の活性を示した。

この結果よりこれらの酵素は、洗剤成分として  
用いることができることがわかる。

#### 4. [図面の簡単な説明]

第1図(a)ないし第1図(c)は本発明の菌  
株により生産された酵素の活性と反応液pHとの  
関係を示すグラフである。第2図(a)ないし第  
2図(c)は本発明の菌株により生産された酵素  
の活性と反応温度との関係を示すグラフである。  
第3図(a)ないし第3図(c)は本発明の菌株  
により生産された酵素の熱安定性を示すグラフで  
ある。

いずれの図においても(a)は67株、(b)は  
68A株、(c)は68B株に関するものである。

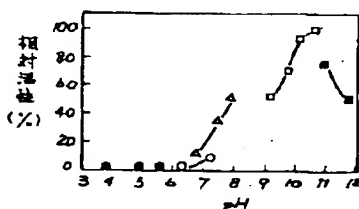
特許出願人 小野田セメント株式会社

代理人 弁理士 湯浅 泰三  
(外5名)

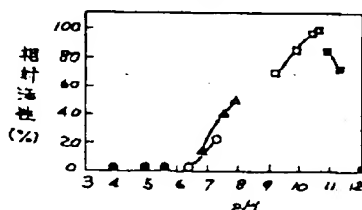


-19-

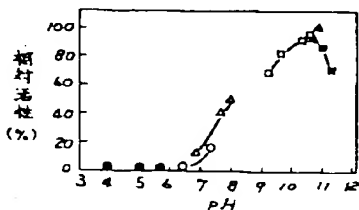
第1図  
(a)



(b)

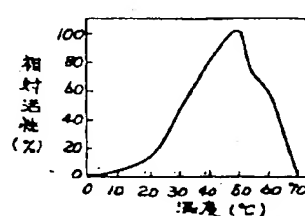


(c)

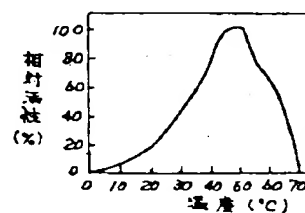


-20-

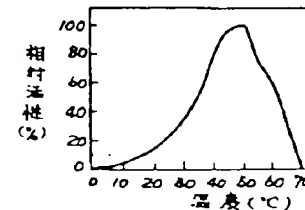
第2図  
(a)



(b)

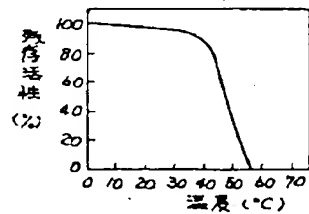


(c)

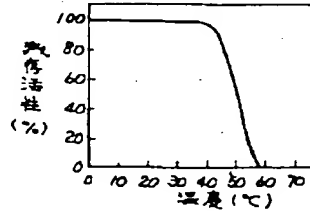




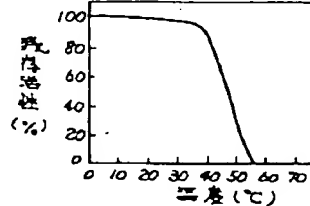
昭和62年7月2日

第3図  
(a)

(b)



(c)



(別紙)

(1) 特許請求の範囲を次の通り補正する。

「(1) 以下の菌学的性質を有するコリネバクテリウム属に属するコリネバクテリウム s.p. No. 11株(微工研菌寄第9335号)、コリネバクテリウム s.p. No. 11A株(微工研菌寄第9336号)、コリネバクテリウム s.p. No. 11B株(微工研菌寄第9337号)からなる群から選択されたアルカリプロテアーゼ産生微生物。

## 1) 形態

培地に生育した細胞について、観察すると、以下の形態学的特徴を有する。

## ① 細胞の形及び大きさ

いずれの株も、短-長桿菌であり、細胞両端は丸みをもつ。

大きさは、

- No. 11 短径 0.5~0.6、長径 1~4 (μm)  
 No. 11A 短径 0.5~0.6、長径 1~1.5 (μm)  
 No. 11B 短径 0.5~0.6、長径 1~3 (μm)  
 である。

特許庁長官 小 川 邦 夫 殿

## 1. 事件の表示

昭和62年特許願第115453号

## 2. 発明の名称

アルカリプロテアーゼ産生微生物

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所

名 称 (024) 小野田セメント株式会社

## 4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
 新大手町ビル206号室  
 電話(270)-8641~8

氏 名 (2770) 弁理士 湯 浅 孝 三

## 5. 補正の対象

明細書の「特許請求の範囲」と「発明の詳細な説明」の欄

## 6. 補正の内容

別紙の通り

方式  
審 査

## ② 細胞の多形性

細胞の長さの他は認められない。

## ③ 運動性

いずれの株も運動性を有する。11株、11A株は数本の周鞭毛を有し、11B株は鞭毛を有さない。

## ④ 孢子

いずれの株も耐熱性孢子を形成しない。

## ⑤ グラム染色性

いずれの株も陽性であるが、培養が進むと陽性が弱くなる傾向がある。

## ⑥ 抗酸性

いずれの株も陽性である。

## 2) 次の各培地における生育状態

## ① 肉汁庫天培養

いずれの株もpH11~11.5で良好に生育し、平面培地においてコロニーは円形、隆起状、周縁は全縁で光沢があり不透明である。色は黄と橙の中間色である。培地中には色素を出さない。

## ② 肉汁液体培養

いずれの株も良好に生育し、培地の混濁は見られず透明であり、沈澱も無い。

## ③ 肉汁ゼラチン穿針培養

pH 11.5 にていずれも層状に液化する。

## 3) 生理学的性質

## ① 硝酸塩の還元

いずれの株も還元しない。

## ② 脱窒反応

いずれの株も嫌気条件下では生育しない。

## ③ VP テスト

いずれの株もアルカリ性培地を用いた場合、陰性である。

## ④ デンプンの加水分解

いずれの株も加水分解する。

## ⑤ 無機窒素源（硝酸塩及びアンモニウム塩）の利用

いずれの株も硝酸塩、アンモニウム塩のいずれも利用しない。

## ⑥ 色素の産生

いずれの株も産生しない。

## ⑦ オキシダーゼ

いずれの株も陰性である。

## ⑧ カタラーゼ

いずれの株も陰性である。

## ⑨ 生育の範囲

I) 生育 pH: いずれの株も 11.0 ~ 11.5 で生育するが、pH 11 付近が最適である。pH 7 では殆ど生育しない。

II) 生育温度: 67 株は 45℃ 以下で生育し、61A 株、61B 株は 45℃ 以下で生育する。いずれの株も 37℃ 付近が最適である。

## ⑩ 酸素に対する態度

いずれの株も好気性である。

## ⑪ O-F テスト

いずれの株も嫌気条件下では生育しない。

## ⑫ 糖類から酸の産生

+ は生成することを示し、- は生成しないことを示す。

-3-

-4-

糖 類	67 株	61A 株	61B 株
L-アラビノース	-	-	-
D-キシロース	-	-	-
D-グルコース	+	+	+
D-マンノース	-	+	-
D-フラクトース	+	+	+
D-ガラクトース	-	-	-
麦芽糖	+	+	+
ショ糖	+	+	+
乳糖	-	+	-
トレハロース	+	+	+
D-ソルビット	-	-	-
D-マンニット	-	-	-
イノシット	-	-	-
グリセリン	+	+	+
でんぷん	+	+	+

## 4) その他の性質

## ① ゼラチンの液化

いずれの株も液化する。

## ② 塩化ナトリウムの耐性

いずれの株も 11% 塩化ナトリウム存在下で生育する。

(2) コリネバクテリウム属に属するアルカリプロテアーゼ生産菌を培養し、培養物からアルカリプロテアーゼを得ることを特徴とするアルカリプロテアーゼの製造方法。

(3) 前記コリネバクテリウム属に属するアルカリプロテアーゼ生産菌がコリネバクテリウム s.p. No. 67 株（農工研菌寄第 9335 号）、コリネバクテリウム s.p. No. 61A 株（農工研菌寄第 9336 号）、コリネバクテリウム s.p. No. 61B 株（農工研菌寄第 9337 号）からなる群から選抜された菌株であることを特徴とする特許請求の範囲第 2 項記載のアルカリプロテアーゼの製造方法。」

(2) 明細書の第 11 頁第 13 行の「嫌気条件下では」を削除する。

(3) 明細書の第 12 頁第 10 行の「陰性」を「陽性」と補正する。

以上

-5-

-450-

-6-